

УДК 575:594:574.64

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДНК ДВУСТВОРЧАТОГО МОЛЛЮСКА *MYTILUS TROSSULUS* ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИОНОВ МЕДИ

С. П. Кукла, В. В. Слободскова, В. П. Челомин

Тихоокеанский океанологический институт им. В. И. Ильичёва ДВО РАН, Владивосток, РФ,
cthulhu-fhtan@mail.ru

Изучено воздействие ионов меди на целостность молекулы ДНК моллюска *Mytilus trossulus* и её восстановление после прекращения воздействия. Используя метод ДНК-комет, показано, что воздействие ионов меди в течении 7 дней вызывает деструктивные изменения ДНК. После прекращения воздействия зафиксировано постепенное восстановление целостности ДНК.

Ключевые слова: *Mytilus trossulus*, генотоксичность, восстановление ДНК, метод ДНК-комет, медь, жабры

Известно, что накопление в организме таких металлов, как медь, приводит к цитологическим, физиологическим и поведенческим изменениям. Однако воздействие ионов тяжёлых металлов проявляется уже на молекулярном уровне, воздействуя на целостность молекулы ДНК. Любые изменения в целостности ДНК (модификация азотистых оснований, образование аддуктов, одно- и двунитевые разрывы, межнитевые сшивки) могут привести к неблагоприятным последствиям для организма и популяции в целом. В связи с этим остро стоит вопрос, способны ли морские организмы, подвергшиеся генотоксическому воздействию загрязняющих веществ, восстанавливать полученные повреждения. Нами поставлена цель: изучить возможность восстановления генетического аппарата *Mytilus trossulus* после воздействия ионов меди, используя метод ДНК-комет.

Материал и методы. Моллюсков собирали в бухте Средняя залива Восток. Особи размером от 4,5 до 5 см в течение 7 дней подвергали воздействию ионов меди (раствор Cu_2SO_4) в концентрации 20 мкг/л. Воду в аквариумах меняли 2 раза в сутки с поддержанием нужной концентрации меди. По прошествии 7 дней экспозиции мидии (по 8 экз. из каждой группы) были препарированы, из них извлечены жабры, которые использовались в кометном анализе. После этого мидии находились в тех же условиях, но без добавления Cu_2SO_4 в воду. Мидии после 1, 3 и 5 суток также отбирались на анализ для выявления факта восстановления ДНК.

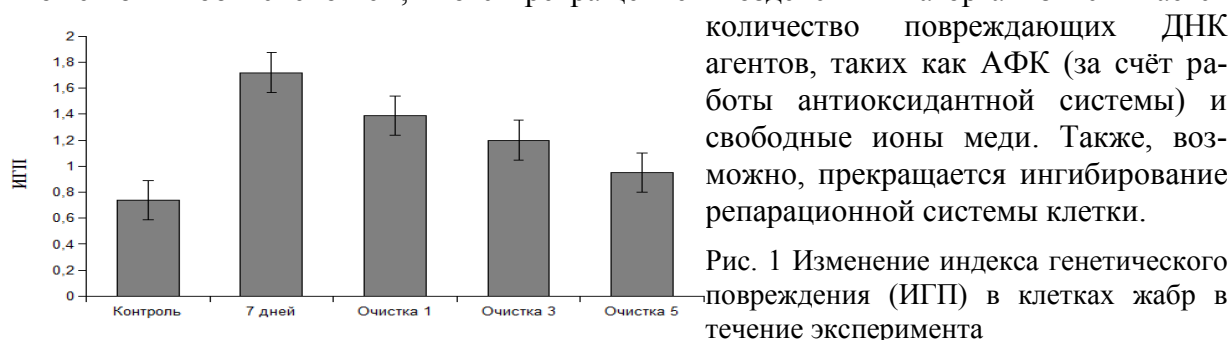
При определении количества повреждений в молекуле ДНК использовали щелочной вариант кометного анализа [1], адаптированного к морским организмам [2]. Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с помощью сканирующего флуоресцентного микроскопа (Zeiss, AxioImager A1), оснащенного цифровой фотокамерой AxioCam MRc. Для обработки цифровых изображений использована компьютерная программа CometScore Freeware v1.5, которая позволяет вычислять различные параметры комет, указывающие на степень повреждения клеточной ДНК. Для визуальной классификации комет применяли метод [3], предполагающий деление комет на 5 классов (C0, C1, C2, C3, C4) по степени фрагментации молекулы ДНК. Исходя из количества комет, принадлежащих к каждому классу, рассчитывали индекс генетического повреждения (ИГП) $(C1+2*C2+3*C3+4*C4)/(C0+C1+C2+C3+C4)$ [4].

Статистическая обработка полученных результатов выполнена с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 и Microsoft Excel 2003.

Результаты и обсуждение. После 7 дней экспозиции ионами меди индекс генетического повреждения в клетках жабр по сравнению с организмами контрольной группы почти в 2,5 раза выше (1,72 против 0,74), что свидетельствует об изменении

внутреннего гомеостаза клетки и накоплении повреждений в молекуле ДНК. Причиной генотоксического эффекта могло являться как образование активных форм кислорода (АФК) в результате воздействия ионов, взаимодействующих со всеми структурами клетки, в том числе с молекулой ДНК [5, 6], так и непосредственное воздействие ионов меди на генетический аппарат клетки. Кроме того, накопление повреждений может быть вызвано или усугублено повреждением репарационного аппарата клетки.

Уже на первый день после прекращения воздействия ИГП в клетках исследуемых организмов уменьшился на $\approx 20\%$ от первоначальной величины. Через 3 и 5 дней ИГП также уменьшался и достиг минимального значения к пятым суткам (рис. 1). Это может быть объяснено тем, что с прекращением воздействия на организм снижается



количество повреждающих ДНК агентов, таких как АФК (за счёт работы антиоксидантной системы) и свободные ионы меди. Также, возможно, прекращается ингибирование репарационной системы клетки.

Рис. 1 Изменение индекса генетического повреждения (ИГП) в клетках жабр в течение эксперимента

Выводы. Генетический аппарат двусторчатого моллюска *M. trossulus*, находясь в благоприятных условиях, способен восстановить повреждения, полученные в результате длительного негативного воздействия среды.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-04-06526 А.

1. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // Exp. Cell Res. 1988. Vol. 175. P. 184–191.
2. Mitchelmore C.L., Birmelin C., Livingstone D.R., Chipman J.K. Detection of DNA strand breaks in isolated mussels (*Mytilus edulis*) digestive gland cells using the “Comet” assay // Ecotoxicology and Environmental Safety. 1998. Vol. 41. P. 51–58
3. Collins A.R., Ma A.G., Duthie S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidine) in human cells // Mutat. Res. 1995. Vol. 336. P. 69–77.
4. Cavas T., Konen S. *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay // Aquat. toxicol. 2008. Vol. 90. P. 154–159.
5. Raimundo J., Costa P. M., Vale C., Costa M. H., Moura I. (2010) DNA damage and metal accumulation in four tissues of feral *Octopus vulgaris* from two coastal areas in Portugal. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73:1543-1547.
6. Schwarz J. A., Mitchelmore C. L., Jones R., O’Dea A., Seymour S. (2013) Exposure to copper induces oxidative and stress responses and DNA damage in the coral *Montastraea franksi*. Comp. Biochem. Physiol. 157 C: 272-279.

THE REPAIR OF DNA IN BIVALVE MOLLUSK *MYTILUS TROSSULUS* AFTER COPPER IONS EXPOSURE

S. P. Kukla, V. V. Slobodscova, V. P. Chelomin

Ilichev Pacific Oceanology Institute, FEB of RAS, Vladivostok, RF, cthulhu-htan@mail.ru

The influence of copper ions on *Mytilus trossulus* DNA integrity and its repair after exposure end are investigated. Using of comet assay it’s shown that the destructive changes of DNA were induced by 7 days’ exposure of copper ions. The gradual reparation of DNA after end of exposure is showed.

Key words: *Mytilus trossulus*, genotoxicity, DNA repair, comet assay, copper, gills